



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Trabalho de Conclusão de Curso



**Otimização e Avaliação do Extrato Hidroalcoólico de *Schinus
terebinthifolius* Raddi Obtido por Ultrassom**

Anne Kaliery de Abreu Alves

João Pessoa – Paraíba

2013

Anne Kaliery de Abreu Alves

Otimização e Avaliação do Extrato Hidroalcólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi Obtido por Ultrassom

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, sob orientação do Prof. Pablo Queiroz Lopes

João Pessoa- Paraíba
2013

A474o *Alves, Anne Kaliery de.*

Otimização e avaliação do extrato hidroalcoólico de *schinus terebinthifolius raddi* obtido por ultrassom / Anne Kaliery de Abreu Alves. -- João Pessoa: [s.n.], 2013.

51f. : il. –

Orientador: Pablo Queiroz Lopes.

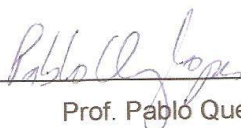
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

Anne Kaliery de Abreu Alves

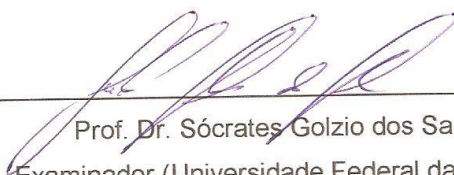
Otimização e Avaliação do Extrato Hidroalcólico de *Shinus terebinthifolius* Raddi Obtido por Ultrassom

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia sob orientação do Prof. Pablo Queiroz Lopes.

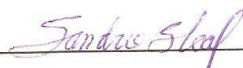
Aprovado em: 05 / 09 / 2013



Prof. Pablo Queiroz Lopes
Orientador (Universidade Federal da Paraíba)



Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
Examinador (Universidade Federal da Paraíba)



Farm. Msc. Sandro de Sousa Leal
Examinador externo (Laboratório Rabelo)

Agradecimentos

À **Deus** por toda força e coragem que me fez ter durante os anos da graduação e por cada dia me ensinar a ver em primeiro lugar o que existe de bom em cada situação vivida.

À minha **família**, pelo amor, paciência e compreensão durante todo esse período de estudo.

Ao professor **Pablo Queiroz Lopes** e a professora **Fabíola Bernardo Carneiro** pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Aos examinadores **Sócrates Golzio** e **Sando Leal** pela disponibilidade em fazer parte desse trabalho e contribuir cientificamente com o mesmo.

Aos meus amigos das **turmas 2007.2, 2008.1 e 2008.2** agradeço por todos os momentos que passamos juntos. Em especial quero agradecer a **Geisa, Madson, Taynara, Rafaela, Édila, Tatyanna Kelvia, Edgar, Ana Edite, Danielle e Ramon** por todos os trabalhos em equipe, as conversas e as risadas que sem dúvida marcam esse período. Não posso deixar de agradecer também a **Ayala Nara e Genivaldo Neto** pelos momentos alegres em sala, nos trabalhos em equipe e no estágio.

A todos os professores da graduação que contribuíram para minha formação acadêmica. Especialmente aos queridos (as): **Adalberto, Alba, Inês, Bagnólia, Marianna, Pablo, Zélia, Edeltrudes e Liana**.

Aos meus queridos professores **Adalberto e Alba** não tenho palavras suficientes para expressar a admiração e o carinho especial que sinto. Esse agradecimento vai além do conhecimento transmitido, pois a amizade e o afeto familiar que construímos ultrapassaram os portões da universidade. Espero poder compartilhar muitas outras conquistas com vocês ao meu lado.

Quero agradecer ao Laboratório de Imunologia e especialmente a professora **Sandra Rodrigues Mascarenhas** pela oportunidade de participação na iniciação científica sob sua orientação, como também a confiança em me tornar

integrante da equipe do projeto de Inclusão Social de Surdos desenvolvido sob sua coordenação.

Aos amigos (as) da pesquisa: **Juliana, Jacqueline, Adriano, Laércia e José Guilherme** eu quero agradecer pelo auxílio nos experimentos, pelas conversas e amizade durante esse período.

Quero agradecer a professora **Eliane Duarte** por acreditar e confiar no meu trabalho com a extensão PAECIBIO.

Quero agradecer a atenção e o auxílio dos funcionários (as) do CCS: **Igara, Renata, Bernadete, Djean, Uitacira, Zuleide, Júlio e Fátima.**

Quero também agradecer aos funcionários (as) do setor de Análises Clínicas do Hospital Universitário Lauro Wanderley por todo o auxílio durante o estágio: **Neusa (micologia), Aracy, Neusa (bioquímica), Ivonete, Verônica, Alba, Beatriz, Karla Germana, Alcides e Fátima.**

Lista de figuras

Figura 1: Folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Figura 2: Representação esquemática da liberação dos constituintes químicos por processo de ultrassom.

Figura 3: Representação do sistema de cromatografia gasosa.

Figura 4: Cromatograma do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi a 80% por GC-FID mostrando a maior concentração de α -pineno obtida.

Figura 5: Cromatograma do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi a 70% por GC-FID, mostrando a maior concentração de limoneno obtida.

Figura 6: Cromatograma do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi referente a 30% por GC-FID mostrando os picos dos constituintes α -pineno e limoneno obtida.

Figura 7: Cromatograma do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi obtido por 10 minutos de extração por ultrassom.

Lista de tabelas

Tabela 1: Concentração de α -pineno e limoneno na extração por diferentes proporções de etanol (50, 70, 80 e 96%).

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos dos extratos obtidos por diferentes concentrações do solvente.

Tabela 3: Quantificação dos constituintes químicos por GC-FID de acordo com a proporção droga/solvente.

Tabela 4: Cinética de extração dos constituintes químicos.

RESUMO

Schinus terebinthifolius Raddi é uma planta da família Anacardiaceae, nativa do Brasil. Já foram isolados dessa planta diversos metabólitos secundários: terpenos, lectinas, saponinas, taninos, compostos fenólicos, flavonóides e alcalóides, responsáveis por diversas atividades biológicas: antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-hipertensiva e hipolipidêmica. O objetivo do trabalho é otimizar e avaliar as condições de extração de substâncias ativas presentes em folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi por ultrassom. As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (100 g) foram colocadas em etanol a 50, 70, 80 e 96% para extração por ultrassom. Os extratos obtidos foram analisados por CG-FID e apresentaram uma maior concentração de α -pineno (0,0225 $\mu\text{L/mL}$) e limoneno (0,1475 $\mu\text{L/mL}$) no teor de álcool de 80% e 70% respectivamente. Esses extratos foram avaliados por parâmetros físico-químicos de pH (4,85, 4,96, 5,36 e 5,79), resíduo seco (0,0546g, 0,0653g, 1,2074g e 1,0501g), densidade (0,9253, 0,9185, 0,9037 e 0,8546) e índice de refração a 20 °C (1,3620, 1,3622, 1,3653 e 1,3657), respectivamente. A maior obtenção do resíduo seco foi na extração em 80% de etanol. Utilizamos esse teor alcoólico com diferentes proporções da droga (10, 20 e 30 %) e obtivemos a maior concentração de α -pineno (0,0037 $\mu\text{L/mL}$) e limoneno (0,0473 $\mu\text{L/mL}$) em 30%. Para otimizar a extração realizamos uma cinética de extração na proporção e teor de álcool por um período de 5 a 60 minutos. O tempo de melhor extração do α -pineno (0,02024 $\mu\text{L/mL}$) e do limoneno (0,15911 $\mu\text{L/mL}$) foi 10 minutos. O conhecimento das condições de extração e do comportamento químico dos constituintes de uma planta representa um passo fundamental para a avaliação de um extrato.

Palavras chaves: *Schinus terebinthifolius* Raddi, extração, ultrassom

Sumário

1.Revisão bibliográfica -----	11
1.1 Uso de plantas medicinais -----	11
1.2 Shinus terebinthifolius Raddi -----	15
1.2.1 Conhecimento sobre a espécie -----	15
1.2.2 Constituintes químicos -----	16
1.2.3 Atividades biológicas -----	17
1.3 Importância da padronização do extrato -----	19
1.4 Método de extração por ultrassom -----	20
1.5 Cromatografia gasosa -----	23
Artigo -----	27
Resumo -----	28
2. Introdução -----	30
3. Metodologia -----	31
3.1 Obtenção da droga vegetal -----	31
3.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico por ultrassom -----	31
3.3 Cinética de extração -----	31
4. Análises físico-químicas -----	31
4.1 Determinação da densidade relativa -----	32
4.2 Determinação do pH -----	32
4.3 Índice de refração (nD-TC a 20 °C) -----	32
4.4 Quantificação dos marcadores -----	32
5. Resultados e discussão -----	33
6. Considerações finais -----	40
7. Agradecimentos -----	41
8. Referências -----	42

Revisão
bibliográfica

1. Revisão bibliográfica

1.1 O uso de plantas medicinais

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças se perpetuou na história da civilização e chegou até os nossos dias, sendo amplamente utilizado por grande parte da população mundial. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial já usaram algum tipo de erva, na busca de alívio de alguma sintomatologia desagradável (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais, conhecida atualmente como fitoterapia, durante vários séculos constituiu a base terapêutica da prática médica. A partir do século XIX, com o progresso da química, as moléculas ativas foram extraídas das plantas e reproduzidas artificialmente, o que, somado ao desenvolvimento da indústria farmacêutica, levou a maioria da população a substituir progressivamente as plantas *in natura* pelas drogas, não por ineficiência das primeiras, mas, principalmente, pela maior oferta dos medicamentos sintéticos que, pela comodidade, foram mais aceitos pelas populações, principalmente dos centros urbanos maiores (SCHMOURLO et al., 2005).

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e das inter-relações animais/plantas. Neste sentido, a natureza forneceu muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é um passo muito importante. A escolha pode ser feita de várias maneiras através do uso tradicional, dos componentes químicos, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A estratégia mais comum é o uso das fontes naturais baseado na medicina popular, que é conhecida como etnofarmacologia (RATES, 2001) Atualmente, muitas plantas que estão sendo estudadas são capazes de atuar no comportamento, humor, pensamento e sensações, diante disso o entendimento de seus mecanismos de ação, segurança e eficácia torna-se um desafio para os pesquisadores (CARLINE, 2003; CARLINE, et al, 2006).

Segundo TOMAZZONI, et al., (2006), o emprego de plantas com fins terapêuticos, sem orientação apropriada, é fator de preocupação que deve ser considerado por profissionais do setor de saúde, bem como aqueles envolvidos na educação para a saúde, devido a incidência de espécies com registro de toxicidade e contra-indicações de uso.

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário é considerado como uma serie de processos envolvidos na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento, enquanto o metabolismo secundário consiste num sistema com importante função para a sobrevivência e competição no ambiente. Plantas elaboram uma grande variedade de produtos e muitos deles estão envolvidos em conferir vantagens seletivas contra ataques microbianos. Avanços na tecnologia molecular conduzem ao melhor entendimento dos mecanismos enzimáticos envolvidos nas complexas vias de biossíntese desses produtos. A engenharia das vias metabólicas dos produtos naturais tornou-se uma estratégia para aumentar a resistência da planta às doenças (DIXON, 2001).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou as substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica,

a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG et al., 2001).

A triagem fitoquímica preliminar consiste na caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes em uma espécie vegetal, desenvolvida a partir do processo extrativo de substâncias presentes na planta com a utilização de um solvente adequado e posterior caracterização dessas substâncias no extrato. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridades também crescentes (FALKENBERG et al., 2001).

O solvente utilizado deve ser o mais seletivo possível para extrair apenas as substâncias de interesse ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair determina o solvente ou mistura de solventes que se aproxima do ótimo de seletividade para a extração (FALKENBERG et al., 2001).

Considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, os produtos naturais se diferenciam dos sintéticos sob o aspecto da diversidade molecular. Sabe-se que a diversidade molecular dos produtos de origem natural é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, é ainda limitada. Isso proporciona a elaboração de diversos novos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (NISBET; MOORE, 1997). No Brasil, as experiências atreladas ao conhecimento popular aproximam a utilização de produtos naturais aos recursos terapêuticos disponíveis, sendo, inclusive, esta prática recomendada pelo poder público (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso de muitas comunidades e grupos étnicos para buscar a cura e alívio para as doenças que acometem o homem (DI STASI, 1996). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial utiliza

plantas medicinais, em sua maioria nos países em desenvolvimento (GURIB-FAKIM, 2006).

O Ministério da Saúde (MS) com o objetivo de normatizar as políticas e diretrizes para a construção das estruturas básicas para o atendimento da população com medicamento fitoterápico aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - DECRETO Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). O MS enfatiza a necessidade de promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, respeitando a diversidade cultural, o conhecimento popular, a tecnologia para validação e o interesse institucional em desenvolver produtos e/ou programas científicos como alavanca para este desenvolvimento.

As estratégias dessa proposta estão baseadas no sentido de regulamentar o cultivo, o manejo sustentável, a produção, a distribuição e o uso de plantas medicinais e fitoterápicos. Um outro enfoque está na promoção de formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos, incentivando a formação e a capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação, estabelecendo ao mesmo tempo estratégias de comunicação para divulgação deste setor (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A utilização de plantas medicinais de forma apropriada vem ao encontro das proposições da Organização Mundial de Saúde (OMS), que tem incentivado a valorização das terapias tradicionais, sendo estas reconhecidas como recurso terapêutico muito útil nos programas de atenção primária à saúde, podendo atender muitas das demandas de saúde da população (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). O uso dos fitoterápicos na medicina humana não visa substituir o uso dos medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção de escolha terapêutica dos profissionais de saúde, no sentido de utilizar medicamentos equivalentes, igualmente registrados, possivelmente mais barato e/ou com espectro de ação mais adequados, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes (BRASIL, 1995).

1.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

1.2.1 Conhecimento sobre a espécie

A planta *Schinus terebinthifolius* Raddi ocorre de forma natural na Argentina, Paraguai, Uruguai e no Brasil. Pertence à família Anacardiaceae e possui vários sinônimos, como *Schinus mole* Lineu, *Schinus aroeira* Vell, *Schinus anthartica* Veloso, *Schinus mucromulata* Mart. e *Schinus rhoifolus* Mart. Na cultura popular é conhecida como aroeira da praia, aroeira vermelha, aroeira mansa e careíba (MATOS, 1994; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1995). No Brasil, é encontrada desde o estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Dependendo do ambiente, apresenta-se como arbusto ou árvore com altura de até 10 metros (LENZ; ORTH, 2004).

É um vegetal dióico, isto é, existem árvores fêmeas e árvores machos. As flores são pequenas, branco-esverdeadas, dispostas em inflorescências axilares e terminais do tipo rácemo, e são muito atrativas para abelhas. Os frutos são pequenas drupas, esféricas, rosadas a avermelhadas, que servem como condimento e alimentam as aves silvestres (LORENZI, 2002 ; QUEIRES, 2004).



Figura 1: Folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Fonte: Imagem disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Schinus>

1.2.2 Constituintes químicos

As principais características morfo-histológicas e químicas da espécie indicam que as folhas e as cascas revelam-se ricas em taninos e em óleo essencial, as saponinas estão restritas às cascas. A reação de Shinoda, positiva para as cascas, sugere a presença de flavonóides, o que indica uma potencialização da ação cicatrizante da *Schinus terebinthifolius* Raddi, pois os flavonóides são geralmente anti-inflamatórios, podendo esta planta prestar-se como alternativa eficaz aos anti-inflamatórios de síntese química que provocam irritação gástrica (JORGE; MARKMANN, 1996).

Na casca do caule foi detectada a presença de taninos, que lhe conferem a ação adstringente, desinfetante e antiinflamatório. Em estudos pré-clínicos, utilizando o decocto, ficou comprovado a sua eficácia como protetor gástrico, elevando o pH do suco gástrico de 5,85 para 6,57 (SANTOS, 2006). As plantas dessa espécie contêm óleos essenciais amplamente distribuídos nas suas partes vegetais, tais como folhas, frutos e tronco, e em teores e composições variáveis. Resultados de análises fitoquímicas registraram a presença de alto teor de tanino, biflavonóides e ácidos triterpênicos nas cascas de *S. terebinthifolius*, e de até 5% de mono e sesquiterpenos no óleo essencial de frutos e folhas, demonstrando que alguns componentes dos óleos voláteis possam constituir uma proteção contra predadores e infestantes (LORENZI, 2002; MATOS, 2002).

Diversas funções biológicas da planta são atribuídas aos óleos voláteis, tais como a atração de polinizadores, a defesa contra o ataque de predadores, a proteção contra perda de água e aumento de temperatura e a inibição de germinação. Os óleos essenciais são também considerados como desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação, desempenhando a adaptação do organismo ao meio (SIMÕES et al., 2000; FABROWSKI, 2002).

Óleos essenciais extraídos de diferentes partes de uma mesma planta, apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes, podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores diferentes (ROBBERS et al., 1997). Embora extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, a composição química de um óleo essencial pode variar

significativamente, dependendo ainda de fatores como a época de coleta. As espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de óleos voláteis no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano (REIS et al., 2003) de acordo com o estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário. São normalmente elaborados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular. A biossíntese de óleos essenciais ocorre normalmente em estruturas chamadas tricomas glandulares que estão distribuídos em quantidades diferentes por toda a planta, mas que na maioria das plantas ocorrem principalmente nas folhas e cálices. A composição dos óleos essenciais pode sofrer influência de acordo com o método de extração utilizado, pois suas propriedades bioativas podem ser comprometidas. As características físico-químicas podem ser alteradas pelas condições operacionais empregadas na extração, bem como seus efeitos terapêuticos (ROBBERS et al., 1997). Hoje dispõe-se de métodos que permitem extrair óleos essenciais com um maior grau de pureza e concentração, como é o caso da extração com fluidos supercríticos, que na indústria alimentícia utiliza gás carbônico na extração, fazendo com que não haja resíduos tóxicos.

1.2.3 Atividades biológicas

O uso medicinal da aroeira é descrito há muitos anos e referido desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira em 1926 (OLIVEIRA, 2000). Estudos realizados entre 1960 e 1970 revelaram a presença de diversos compostos químicos, como alcoóis, cetonas, ácidos, mono-, sesqui- e triterpenos, no caule, folhas e frutos da planta (LLOYD et al., 1977). O óleo essencial dos frutos apresenta uma composição tipicamente terpênica (PIERIBATTESTI et al., 1981)

As folhas e cascas do caule dessa planta são usadas na forma de decocto com fins expectorante, anti-séptico, antidiarréico e cicatrizante (DUARTE; TOLEDO; OLIVEIRA, 2006). É conhecida por suas propriedades

adstringente e anti-inflamatória na medicina popular e em preparações cosméticas (PAULO et al., 2009).

As folhas de *S. terebinthifolius* Raddi são comumente utilizadas em diferentes países no tratamento de doenças venéreas, inflamação do útero, infecções do aparelho urinário, feridas na pele, diarreias e úlcera gastroduodenal (DINIZ et al., 1997 ; MARTÍNEZ; ALONSO; BADELL, 1996).

SOARES et al., (2006) determinaram que o extrato alcoólico da aroeira apresentou significativa capacidade de inibir o crescimento, *in vitro*, de várias espécies de bactérias do gênero *Streptococcus*. Estudos com extratos de *S. terebinthifolius* revelaram ação contra *Enterococcus faecalis* (COSTA et al., 2010), *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2006), *Candida albicans* (SCHMOURLO et al., 2005), além de terem demonstrado atividade anti-radicalar em ensaios de peroxidação lipídica (VELÁSQUEZ et al., 2003).

AMORIM e SANTOS (2003) relataram que o gel vaginal de aroeira é efetivo e seguro para o tratamento da vaginose bacteriana, sugerindo também potenciais efeitos benéficos na flora vaginal. Já LUCENA et al, (2006) constataram que o uso de extrato hidroalcoólico de aroeira mostrou efeito cicatrizante favorável nas cistotomias em ratos. QUEIRES (2004) estudou o efeito antiproliferativo de extrato da *S. terebinthifolius* sobre células de câncer de próstata humano, verificando efeito inibidor da proliferação celular, com indução à morte das células cancerígenas. Recentemente foi descrito o seu efeito cicatrizante em modelos de gastrorragias (SANTOS, 2012) e atividade antiproliferativa em células neoplásicas de próstata mantidas em culturas (QUEIRES, et al, 2013).

1.3 Importância da padronização do extrato

O uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (SIMÕES et al., 2001). Diante disso, durante a produção de extratos a partir de matéria prima vegetal, pode-se considerar a padronização como uma condição em que a eficácia do produto é garantida através da constância no teor de princípios

ativos. A padronização de extratos de plantas medicinais visa o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade para a matéria prima vegetal (incluindo extratos vegetais e fito-constituintes) e para o produto finalizado (forma farmacêutica) com rigoroso controle de todas as etapas envolvidas no processamento (SOUZA, 2007).

O extrato de aroeira contém catecóis, taninos, terpenos, flavonóides e saponina. Sobre os flavonóides já foi descrito potencial mutagênico e propriedade antioxidante. A mutagenicidade de alguns flavonóides está associada com a formação de espécies reativas do oxigênio e parece depender do número e posição dos grupos hidroxilas. CARVALHO et al., (2003) avaliaram um extrato da casca do tronco da planta em ensaios bacterianos para determinar seu potencial genotóxico. Os resultados indicaram que a solução produziu mutações e lesões no DNA das bactérias e que o estresse oxidativo pode ter sido responsável pela genotoxicidade. Em vista dos achados, é importante analisar o potencial mutagênico dos produtos fitoterapêuticos comerciais, inclusive a legislação brasileira exige testes de atividade mutagênica para registrar esses medicamentos.

Um dos aspectos importantes para se obter bons rendimentos com a utilização do ultrassom é o estabelecimento de valores apropriados, para parâmetros de extração, relacionados às propriedades biológicas do material a ser extraído (tempo de extração, volume de solvente, polaridade do solvente e outros). Muitos trabalhos de pesquisas vêm sendo conduzidos com o propósito de otimizar as condições de extração (MELECCHI et al., 2006 ; JACQUES et al., 2007).

1.4 Método de extração por Ultrassom

Atualmente a indústria farmacêutica vem pesquisando e desenvolvendo medicamentos a partir de substâncias extraídas desta espécie. Um caso recente é de um laboratório Pernambucano que lançou no mercado nacional um anti-inflamatório e cicatrizante natural para uso ginecológico, que tem como princípio ativo o tanino, substância extraída da casca da aroeira. Apesar do uso

popular dessa planta é necessário ter cuidado como uso e as quantidades empregadas, pois a aroeira tem propriedades químicas tóxicas que causam alergias como dermatites e edemas em pessoas sensíveis. A resina contida em cascas, folhas e frutos pode ser tóxica para humanos e animais e, quando o fruto da aroeira é ingerido, ocorre um efeito paralisante. Os odores exalados pelas flores podem induzir reações alérgicas (MACHADO; GUERREIRO, 2001).

O processo extrativo permite, de forma seletiva e completa, que as substâncias contidas no interior das células das drogas vegetais, sejam removidas utilizando-se soluções apropriadas. O grau de polaridade das substâncias a serem extraídas é inerente a cada material e isso indica a polaridade do líquido extrator ou das misturas de solventes de polaridades diferentes para um ótimo de seletividade (SIMÕES, 2003).

A composição química de um extrato de determinada espécie vegetal pode ser variável em função de diversos fatores, entre eles podem ser citados os parâmetros que influenciam o processo de extração dos princípios ativos. O extrato bruto obtido de plantas frescas ou secas, ou partes de plantas (flores, folhas, frutos, raízes e outros) por diferentes processos de extração é ponto de partida para a descoberta e o isolamento de substâncias bioativas. Técnicas convencionais de extração como percolação, maceração e extração por Soxhlet fundamentam-se na escolha correta do solvente extrator, na agitação, no uso de calor, aumentando assim, a solubilidade dos componentes e a taxa de transferência de massa. Entretanto, tais técnicas necessitam de períodos longos de extração e, em alguns casos, o uso de aquecimento, como na extração por Soxhlet, pode ocasionar degradação de substâncias naturais termicamente instáveis presentes no material vegetal (JIANYONG et al., 2001; VINATORU, 2001; SCHINOR et al., 2004; MELECCHI et al., 2006).

Métodos não convencionais, como ultrassom, têm sido descritos em muitos trabalhos de extração e isolamento de componentes bioativos de materiais vegetais. Alguns dos principais benefícios incluem a redução do tempo de extração, a melhora na eficiência com aumento do rendimento, utilização de temperaturas baixas evitando danos térmicos ao extrato e perda de componentes voláteis, economia no volume de solvente. Outras vantagens

da extração por ultrassom é que se trata de uma técnica simples, rápida, que apresenta elevada reprodutibilidade, baixo custo e permite o uso de amostras de quantidades e tamanhos variados (PANIWNYK et al., 2001; MELECCHI et al., 2006).

O sistema de ultrassom baseia-se na transformação de energia elétrica em energia mecânica, através de dispositivos chamados de transdutores ultrassônicos que provocam uma vibração mecânica em alta frequência (maior que 20 KHz) que se propaga principalmente através de materiais que sejam bons condutores de som, como aço inoxidável, vidro e outros. Esta energia mecânica é chamada de cavitação ultrassônica (KORN et al., 2005).

As ondas ultrassônicas podem ser de alta ou baixa potência. As ondas de alta potência levam a alterações químicas e físicas, no meio líquido onde as ondas são aplicadas. Existem dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas que são o banho e a sonda ultrassônica (BARBOZA; SERRA, 1992). Quando líquidos são submetidos às ondas do ultrassom em alta potência, estas produzem intensas e sucessivas ondas de compressão e rarefação no meio, no qual, a depender da viscosidade, pode ocorrer o surgimento de cavidades de dimensões microscópicas durante uma fase de rarefação. A ocorrência de gases e vapores no meio irradiado faz com que moléculas dos gases e vapores migrem para o interior das cavidades. Nos sucessivos ciclos de compressão e rarefação as dimensões da cavidade vão aumentando até que seja atingido um diâmetro crítico, quando esta finalmente sofre colapso (KORN et al., 2005).

Os primeiros estudos sobre efeitos provocados por ondas de ultrassom datam por volta de 1950 (VINATORU, 2001). A Cavitação é considerada como o ciclo de formação, crescimento e colapso de bolhas micrométricas durante a sonicação. Com os colapsos das bolhas de cavitação ocorre a liberação de grande quantidade de energia para o meio proporcionando, na microrregião onde ocorreu o colapso, aumento da temperatura da ordem de alguns graus centígrados e da pressão para centenas de atmosferas. O colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes (KORN et al., 2005).

Os tecidos vegetais são compostos por células envolvidas por membranas e paredes celulares. Mecanismos de extração envolvem dois tipos de fenômenos físicos: difusão através da parede celular e lavagem do conteúdo intracelular, uma vez que as paredes são rompidas. O provável mecanismo de extração de material vegetal por ultrassom parece envolver o rompimento da parede celular que envolve a célula vegetal por efeitos da cavitação e a intensificação da transferência de massa devido à facilidade de acesso do solvente no interior da célula. O colapso da cavitação de bolhas próximo às paredes das células é esperado produzir rompimento celular juntamente com uma boa penetração do solvente para o interior das células através do jato ultrassônico e liberação dos componentes que estão dentro da célula, resultando no aumento da eficiência da extração e podendo levar também a redução do tempo de extração (JIANYONG et al., 2001; MELECCHI et al., 2006; JACQUES et al., 2007). O ultrassom pode ainda ter sua eficiência aumentada pela redução das partículas do material vegetal, por moagem antes da extração, para aumentar o contato com o solvente extrator (VINATORU, 2001).

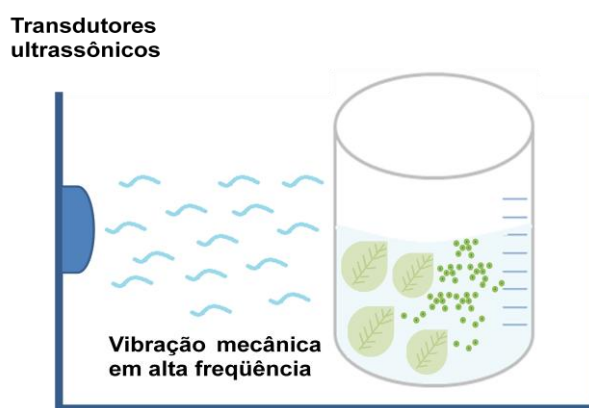


Figura 2: Representação esquemática da liberação dos constituintes químicos por processo de ultrassom.

Atualmente, a extração assistida por ultrasson tem sido utilizada para extrair componentes com potenciais atividades biológicas, tais como flavonóides, polifenóis, hidrocarbonetos saturados, ésteres de ácidos graxos, esteróides, triterpenóides, saponinas (JIANYONG et al., 2001 ; PANIWNYK et al., 2001; SCHINOR et al., 2004; MELECCHI et al., 2006) e também isolamento de componentes voláteis de produtos naturais em temperatura ambiente com solventes orgânicos (ALISSANDRAKIS et al., 2003).

1.5 Cromatografia gasosa

A cromatografia foi relatada pela primeira vez há pouco mais de 100 anos por Mikhail Semenovitch Tswett (1872-1919). No período de 1899 à 1901 Tswett trabalhou em sua primeira pesquisa com a estrutura físico-química da clorofila das plantas, sendo que no ano de 1903 relatou uma nova categoria de análise adsorptiva (ETTRE, 2000). No entanto, as denominações de cromatografia e cromatograma somente surgiram no segundo trabalho de Tswett, publicado em 1906. A palavra cromatografia designava o processo de separação, tendo sua origem do grego *chroma*, com o significado de cor, e também do grego *graphe*, com o significado de escrever. Já a palavra cromatograma refere-se às bandas separadas na coluna (COLLINS, 2006).

A evolução da técnica iniciou-se na cromatografia líquida de adsorção seguida pela cromatografia de partição. Posteriormente surgiu a análise de gases e amostras vaporizadas, seguida pelas trocas iônicas, separação por tamanho molecular e eletrocromatografia (ETTRE, 2000).

A cromatografia tem sido utilizada em diferentes áreas do conhecimento. A grande sensibilidade de técnicas cromatográficas possibilitou o seu uso de forma rotineira em análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do *doping*, controle de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, na toxicologia entre muitas outras aplicações (NAKASHIMA et al., 2005 ; ANVISA, 2012; CHINCHOLE et al., 2012; GILBERT-LÓPEZ et al., 2012; XU et al., 2012).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma

amostra. Dependendo da substância a ser analisada e do tipo de detector empregado pode-se detectar cerca de 10-12g do composto por mL-1, o que permite que pequenas quantidades da amostra sejam analisadas (PERES, 2002).

Na cromatografia gasosa (CG), a amostra é vaporizada e injetada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel. Ao contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função o transporte do analito através da coluna (SKOOG et al., 1998). A cromatografia gasosa é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase móvel por uma fase estacionária sorvente que pode ser líquida ou sólida (AQUINO NETO, 2003). Deve ser utilizada para separar compostos que se volatilizam, ou seja, misturas cujos compostos tenham pontos de ebulição de aproximadamente até 300 °C e que sejam termicamente estáveis nesta condição.

Existem dois tipos de cromatografia gasosa: a cromatografia gás-sólido, na qual a separação baseia-se em mecanismo de adsorção e a cromatografia gás-líquido que se baseia em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a estacionária. A cromatografia gás-líquido corresponde a cerca de 95% do total de aplicações (COLLINS, 2006).

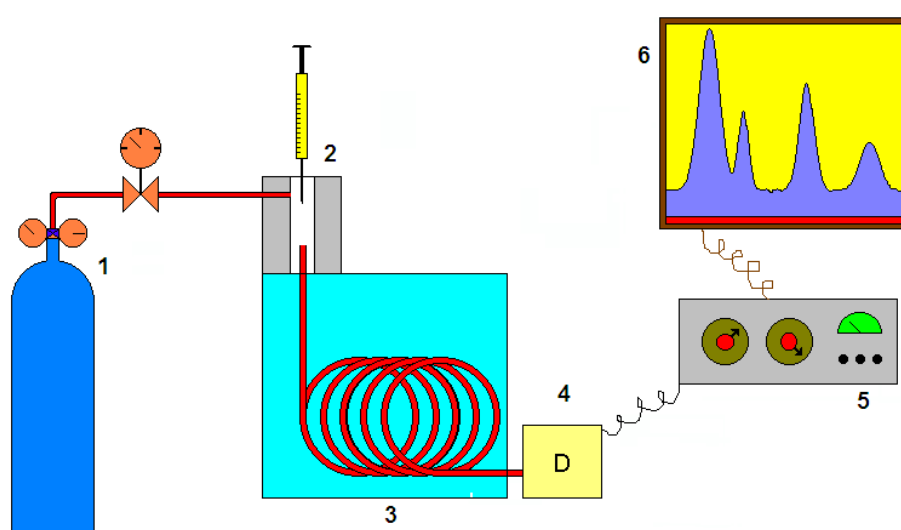


Figura 3: Representação do sistema de cromatografia gasosa. 1 -Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão; 2 -Injetor (Vaporizador) de Amostra; 3 -Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna; 4 -Detector; 5 -Eletrônica de Tratamento (Amplificação) de Sinal; 6 -Registro de Sinal (Registrador ou Computador). Fonte: Goolge imagens (acesso em 20/08/13)

A amostra é introduzida no equipamento através de um injetor sob aquecimento, favorecendo a vaporização dos compostos, um fluxo de gás contínuo carrega a amostra através da coluna, que se encontra em um forno, onde a temperatura pode se manter constante, ou aumentar através de uma rampa de aquecimento. Essa programação de temperatura favorece uma melhor separação dos compostos e diminui o tempo de análise. O analito segue até um detector que gera um sinal para um sistema de aquisição (ROUESSAC; ROUESSAC, 2000).

Detecutores podem ser utilizados, como Detector de Condutividade Térmica, que se baseia na modulação da condutividade térmica dos gases de arraste pelos analitos; Detector de Nitrogênio/Fósforo; de Infravermelho por Transformada de Fourier; Espectrometria de Massas, que é seletivo, sensível e universal e Detector de Ionização de Chama (DIC) ou FID, considerado universal já que é capaz de detectar qualquer substância orgânica (COLLINS et al., 1997).

A alta velocidade com que os componentes separados na coluna chegam ao detector é um fator importante a ser considerado em CG-UR, de modo que a eficiência da separação da coluna não seja comprometida pelo tempo de resposta do detector. Dentre os detectores usualmente empregados em CG, os detectores de ionização em chama (DIC ou FID) e espectrômetro de massas (EM) (BICCHI et al., 2004),

Os detectores de ionização de chama (DIC) são usados para quantificação de compostos orgânicos voláteis em amostras gasosas. Tal detector apresenta uma alta sensibilidade, largo intervalo de resposta e baixo nível de ruído, além de resistente e fácil utilização (SKOOG, 2002).

O DIC foi proposto em 1958, por Harley e de McWilliam e Dewar (BARTLE; MYERS, 2002 p.9). O princípio é de que o composto eluído da coluna (analito), misturado com hidrogênio e ar sintético seja queimado,

produzindo uma chama que tem energia suficiente para ionizar as moléculas do analito que tenham baixos potenciais de ionização. As espécies iônicas produzidas são coletadas por eletrodos e a corrente elétrica resultante é amplificada e enviada para o sistema de registro, conforme ilustra (NETO; NUNES, 2003).

No detector chega o gás de arraste que se mistura com o hidrogênio e ar, produzindo uma chama. Um parâmetro de grande influência no desempenho do detector de ionização de chama é a relação existente entre os gases envolvidos no processo de combustão. Na prática, a razão mais comumente utilizada é 1:1:10 (gás de arraste : hidrogênio : ar sintético), porém os fluxos ideais devem ser determinados experimentalmente, para cada sistema utilizado. Quando compostos orgânicos, por exemplo, pirolisam na temperatura da chama de hidrogênio e ar, ocorre a formação de íons e elétrons que podem conduzir eletricidade através da chama (COLLINS, 2006).

O DIC possui grande aplicabilidade, sendo um detector quase universal na cromatografia de compostos orgânicos voláteis. Tal universalidade, acoplada a sua elevada sensibilidade, alta estabilidade e resposta rápida, faz com que seja o detector mais popular de uso corrente (CIOLA, 1985).

Artigo

Título: Otimização e Avaliação do Extrato Hidroalcólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi Obtido por Ultrasson

Anne Kaliery de Abreu Alves¹; Ana Letícia Braz¹; Fabíola Bernardo Carneiro² e Pablo Queiroz Lopes¹

- 1. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus I, João Pessoa, Paraíba.**
- 2. Laboratório Rabelo, Cabedelo, Paraíba, Brasil.**

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmácia

RESUMO

Schinus terebinthifolius Raddi é uma planta da família Anacardiaceae, nativa do Brasil. Já foram isolados dessa planta diversos metabólitos secundários: terpenos, lectinas, saponinas, taninos, compostos fenólicos, flavonóides e alcalóides, responsáveis por diversas atividades biológicas: antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-hipertensiva e hipolipidêmica. O objetivo do trabalho é otimizar e avaliar as condições de extração de substâncias ativas presentes em folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi por ultrassom. As folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (110 g) foram colocadas em etanol a 50, 70, 80 e 96% para extração por ultrassom. Os extratos obtidos foram analisados por CG-FID e apresentaram uma maior concentração de α -pineno (0,0225 $\mu\text{L/mL}$) e limoneno (0,1475 $\mu\text{L/mL}$) no teor de álcool de 80% e 70% respectivamente. Esses extratos foram avaliados por parâmetros físico-químicos de pH (4,85, 4,96, 5,36 e 5,79), resíduo seco (0,0546g, 0,0653g, 1,2074g e 1,0501g), densidade (0,9253, 0,9185, 0,9037 e 0,8546) e índice de refração a 20 °C (1,3620, 1,3622, 1,3653 e 1,3657), respectivamente. A maior obtenção do resíduo seco foi na extração em 80% de etanol. Utilizamos esse teor alcoólico com diferentes proporções da droga (10, 20 e 30 %) e obtivemos a maior concentração de α -pineno (0,0037 $\mu\text{L/mL}$) e limoneno (0,0473 $\mu\text{L/mL}$) em 30%. Para otimizar a extração realizamos uma cinética de extração na proporção e teor de álcool por um período de 5 a 60 minutos. O tempo de melhor extração do α -pineno (0,02024 $\mu\text{L/mL}$) e do limoneno (0,15911 $\mu\text{L/mL}$) foi 10 minutos. O conhecimento das condições de extração e do comportamento químico dos constituintes de uma planta representa um passo fundamental para a avaliação de um extrato.

Palavras chaves: *Schinus terebinthifolius* Raddi, extração, ultrassom

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius Raddi is a plant family Anacardiaceae, native to Brazil. Have been isolated from this plant several secondary metabolites: terpenes, lectins, saponins, tannins, phenolics, flavonoids and alkaloids, responsible for various biological activities: antibacterial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antihypertensive and hypolipidemic. The objective is to evaluate and optimize the extraction conditions of active substances present in leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi ultrasound. The leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi (100 g) were placed in ethanol at 50, 70, 80 and 96% for extraction by ultrasound. The extracts were analyzed by GC-FID and had a higher concentration of α -pinene (0.0225 mL / mL) and limonene (0.1475 mL / mL) in the alcohol content of 80% and 70% respectively. These extracts were evaluated by physical-chemical parameters of pH (4.85, 4.96, 5.36 and 5.79), dry (0.0546 g, 0.0653 g, 1.2074 g and 1.0501 g), density (0.9253, 0.9185, 0.9037 and 0.8546) and refractive index at 20 ° C (1.3620, 1.3622, 1.3653 and 1.3657), respectively. Most obtaining the dry residue was extracted in 80% ethanol. We use this alcoholic with different proportions of the drug (10, 20 and 30%) and obtained the highest concentration of α -pinene (0.0037 mL / mL) and limonene (0.0473 mL / mL) in 30%. To optimize the extraction conducted an extraction kinetics in proportion and alcohol content for a period of 5 to 60 minutes. The best time to extract the α -pinene (0.02024 mL / mL) and limonene (0.15911 mL / mL) was 10 minutes. Knowledge of the extraction conditions and the chemical behavior of the constituents of a plant represents a key step in the evaluation of an extract.

Keywords: *Schinus terebinthifolius* Raddi, extraction, ultrasound

2. INTRODUÇÃO

A Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta pioneira, da família Anacardiaceae, nativa do Brasil. Essa espécie na cultura popular é conhecida como aroeira da praia, aroeira vermelha, aroeira mansa e careíba (MATOS, 1994; OLIVEIRA, AKISUE; AKISUE, 1995).

Na literatura o estudo das propriedades medicinais da aroeira demonstram a ação do extrato etanólico (30% e 80%) e das suas frações (hexano, clorofórmio e acetato de etila), provenientes da partição deste, como ativos frente aos microrganismos gram-positivos *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2006) e *Bacillus subtilis*, aos gram-negativos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e também o extrato aquoso com atividade contra *Candida albicans* (MARTÍNEZ; ALONSO; BADELL, 1996; MARTÍNEZ, 2000). Mostrou-se eficaz também nas formulações em gel para o tratamento da vaginose bacteriana (AMORIM; SANTOS, 2003). Recentemente foi descrito o seu efeito cicatrizante em modelos de gastrorragias (SANTOS et al., 2012) e atividade antiproliferativa em células neoplásicas de próstata mantidas em culturas (QUEIRES et al., 2013).

O processo extrativo permite, de forma seletiva e completa, que as substâncias contidas no interior das células das drogas vegetais, sejam removidas utilizando-se líquido extrator apropriado. (SIMÕES, 2003).

A extração por ultrassom têm sido descrita em muitos trabalhos. Esse método de extração apresenta vantagens quanto ao tempo de extração, a eficiência do rendimento, utilização de temperaturas baixas evitando danos térmicos ao extrato e perda de componentes voláteis e economia no volume do solvente. Outras vantagens da extração por ultrassom é que se trata de uma técnica simples, rápida, que apresenta elevada reprodutibilidade, baixo custo e permite o uso de amostras de quantidades e tamanhos variados (MELECCHI et

al., 2006). Neste trabalho o objetivo é otimizar as melhores condições de extração pelo método de ultrassom e avaliar a quantificação dos constituintes químicos obtidos utilizando cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (GC-FID).

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção da droga vegetal

As folhas da planta *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletadas e cedidas pelo Laboratório Rabelo em Cabedelo, Paraíba. As folhas dessa planta foram armazenadas em lugar fresco ao abrigo da luz solar e identificadas no herbário da Universidade Federal da Paraíba-UFPB. Os experimentos foram realizados no laboratório Rabelo.

3.2 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos por ultrassom

Foram pesadas 100 g das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram e em seguida colocadas em erlenmeyer com 1000 mL da mistura etanol: água nas seguintes proporções em relação ao etanol: 96, 80, 70 e 50%. Com o teor alcoólico de melhor rendimento foram preparados outros extratos variando a proporção em 10, 20 e 30% da droga vegetal.

3.3 Cinética de extração

Os extratos obtidos, com o teor alcoólico e a proporção da droga, de maior rendimento foram submetidos a uma cinética de extração durante 6 intervalos de tempo. O rendimento foi avaliado nos tempos de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após o início da extração por ultrassom.

4 Análises físico-químicas

4.1 Determinação da densidade relativa

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, obteve-se o valor da densidade relativa pesando-se o picnômetro de 25 mL de volume, previamente calibrado, com água destilada e posteriormente com os extratos, obtidos a ser testado a 20° C. O valor da densidade relativa foi calculado pelo quociente entre a massa do extrato e a massa de água contida no picnômetro.

4.2 Determinação do pH

Foi realizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição que prevê a aferição do aparelho com as leituras de soluções-tampão (pH = 4,0 e pH = 7,0). A determinação do pH foi realizada empregando aparelho de marca Orion modelo 420A, com amostras de 10 mL dos extratos. As análises em triplicata para cada um dos extratos não variaram mais do que $\pm 0,05$ de unidade.

4.3 Índice de refração (nD-TC a 20 °C)

Foram colocados os extratos no refratômetro, usando luz branca para avaliar o índice de refração em termos de comprimento de onda correspondente ao da luz da raia D de sódio ajustados à temperatura de 20°C, conforme estabelecido na Farmacopéia Brasileira (2010).

4.4 Determinação do resíduo seco

A obtenção do resíduo seco dos extratos foi realizada com amostras de 10 g dos extratos. Procedeu-se a evaporação, primeiramente em banho de água quente ou com auxílio do bico de bunsen, em cápsulas de porcelana com 30 mL de capacidade e previamente taradas. A dessecação foi concluída na estufa, a 105° C, durante 3 horas, deixando resfriar em dessecador com ácido sulfúrico e posterior pesagem. O valor do resíduo seco foi calculado em porcentagem. As análises para cada um dos extratos foram realizadas em triplicada.

4.5 Quantificação dos marcadores α -pineno e limoneno

As análises por cromatografia gasosa (GC) acoplada ao detector de ionização de chamas (FID) foram realizadas em todas as amostras obtidas durante a escolha do teor alcoólico, da proporção da droga e da cinética de extração. Para tanto utilizou-se um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, provido de um auto injetor AOC-20i e detector de ionização de chama FID-2010 Plus. A coluna utilizada foi coluna capilar DB-1 de dimetilpolisiloxano (100%), marca Restek, de 30m x 0,25mm e fase estacionária com 0,25 μ m de espessura. Utilizou-se o nitrogênio (N₂) como gás de arraste.

5 Resultados e Discussão

No óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi, já foram identificados mono e sesquiterpenos (em teor de 1% para as folhas e 5% para os frutos), além de taninos, resinas, alcalóides, flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenos. Para as sementes é citado um teor de óleo fixo da ordem de 14% (ALMEIDA, 1993). O produto contém, dentre outros compostos, *cis*-sabinol, *p*-cimeno, limoneno, simiarenol, *alfa* e *beta*-pineno, *delta*-caroteno, terebintona, eschinol, ácido masticadienóico, ácido hidroximasticadienóico, sitosterol, baruenona, ácido terebentifólico, quercetina e kaemferol (JOHANN et al., 2010).

As substâncias extrativas obtidas de drogas vegetais dependem de sua própria natureza e/ou da classe das substâncias de interesse e, do solvente utilizado no processo de extração dessas substâncias.

Recentemente outras técnicas de extração em amostras ambientais sólidas têm sido desenvolvidas para tentar reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente como, por exemplo, por ultrassom. Em comparação à extração por Soxhlet, a extração por ultrassom ocorre em curto espaço de

tempo e oferece boa recuperação dos analitos, por meio de um equipamento simples e de fácil operação.

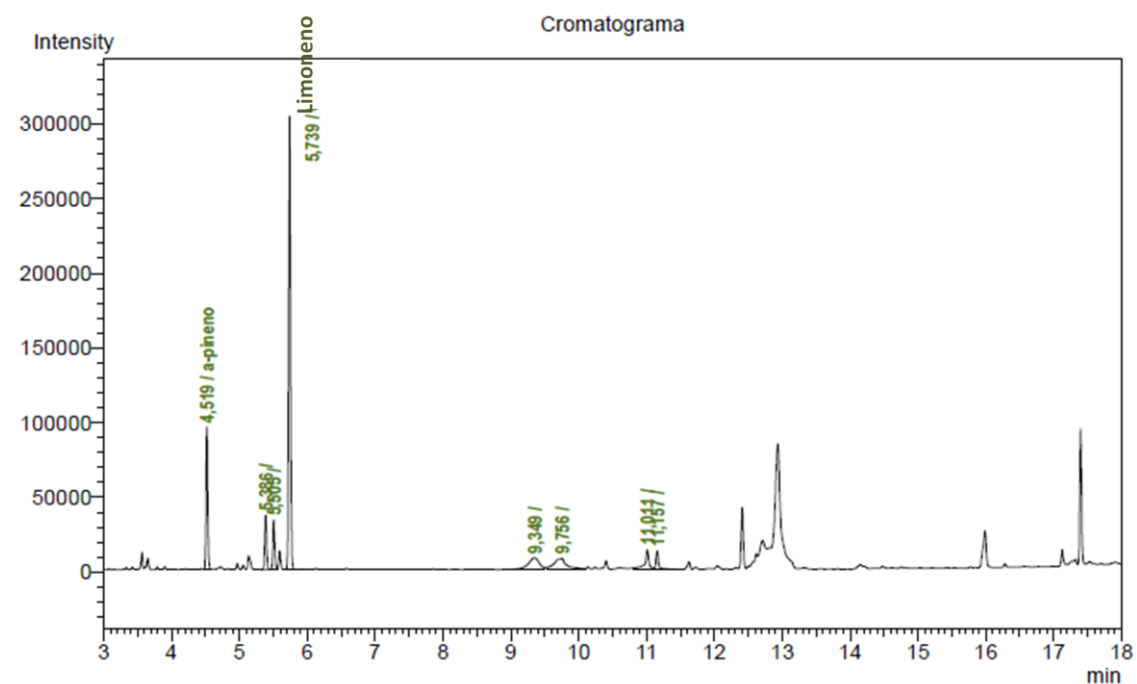
A otimização dos parâmetros de extração por ultrassom, incluindo tipo de solvente ou composição do solvente, tempo de extração, carga da amostra e teor de água, é necessária para a obtenção de uma maior eficiência e reprodutibilidade de extração. Caracterizamos os extratos obtidos quanto à presença dos constituintes químicos α -pineno e limoneno.

O processo extrativo das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi por ultrassom foi o ponto de partida para quantificação dos marcadores químicos. Após a obtenção dos extratos com os diferentes teores (50, 70, 80 e 96%) da mistura EtOH:água e de acordo com o rendimento de cada extrato analisado por GC, obtivemos a maior concentração de α -pineno (0,0225 $\mu\text{L/mL}$) em 80% e de limoneno (0,1475 $\mu\text{L/mL}$) em 70% como pode ser visto na tabela 1 e no cromatograma 1 e 2, respectivamente.

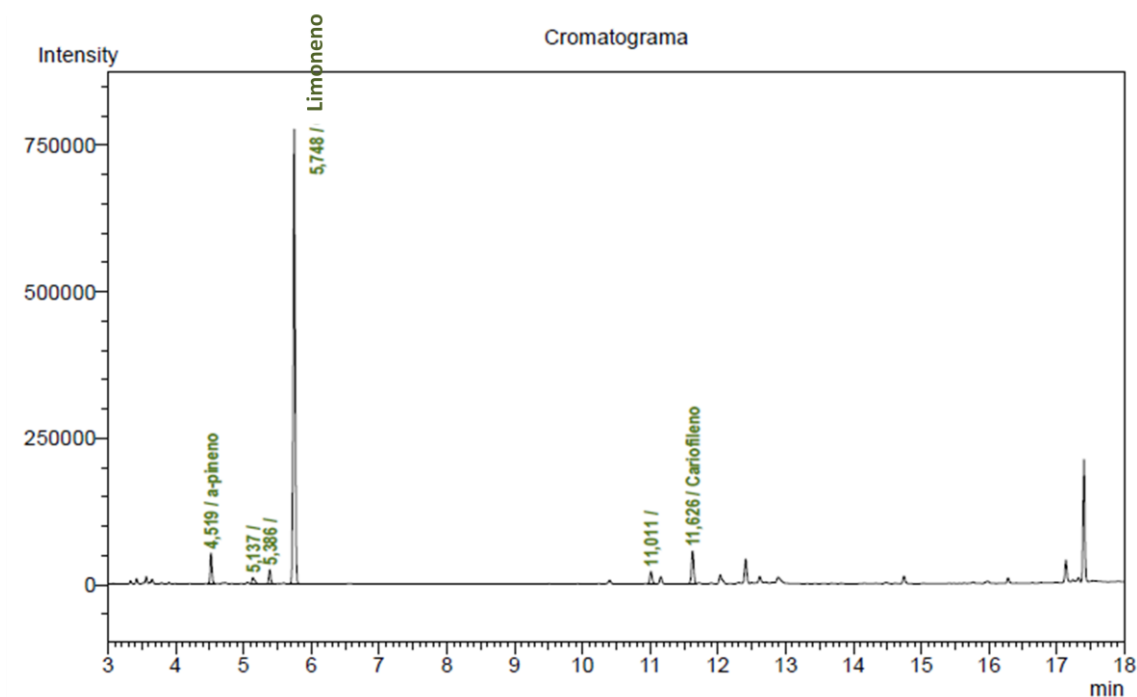
Extrato	Teor de álcool (%)	α -pineno ($\mu\text{L/mL}$)	Limoneno ($\mu\text{L/mL}$)
A1	50	0,0033	0,0433
A2	70	0,0126	0,1475
A3	80	0,0225	0,056
A4	96	0,0076	0,0815

Tabela 1: Concentração de α -pineno e limoneno na extração por diferentes proporções de etanol (50, 70, 80 e 96%).

Os cromatogramas representam o registro original obtido por GC-FID. Podemos observar o tempo de retenção de cada amostra até formar o pico referente aos constituintes químicos de interesse.



Cromatograma 1: Espectro do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi a 80% por GC-FID, mostrando a maior concentração de α -pineno obtida.



Cromatograma 2: Espectro do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi a 70% por GC-FID, mostrando a maior concentração de limoneno obtida.

Todas as amostras extraídas foram filtradas e analisadas diretamente por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas, onde o valor expresso de cada concentração está contido na área referente ao pico apresentado por cada substância.

A presença desses constituintes químicos nos extratos obtidos corrobora com a literatura que descreve que na obtenção do óleo essencial de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram identificados compostos químicos majoritários distintos, como α -pineno, limoneno, sabineno, β -pineno, cariofileno, germacreno-D, biciclogermagreno e *trans*-cariofileno (MOURA et al., 2007; SANTOS et al., 2007). Nos estudos de LIMA (2011) foi evidenciado que O melhor rendimento dos marcadores escolhidos para duas plnatas, uma delas sendo a *Schinus terebinthifolius* Raddi, a maior concentração do α -pineno foi observada nos extratos obtidos em processos de maceração com graduação alcoólica de 80 %.

Outros parâmetros utilizados para padronização dos extratos obtidos foram às análises físico-químicas através das determinações de: densidade relativa, pH, índice de refração e resíduo seco. Os resultados dessas análises estão expressos na tabela 2.

Extrato	Teor de álcool (%)	pH	Densidade relativa (g/mL)	Índice de refração (a 20 °C)	Resíduo seco (g)
A1	50	4,85	0,9253	1,3620	0,0546
A2	70	4,96	0,9185	1,3622	0,0653
A3	80	5,36	0,9037	1,3653	1,2074
A4	96	5,79	0,8546	1,3657	1,0501

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos dos extratos obtidos por diferentes concentrações do solvente.

O principal objetivo que pretende-se atingir ao preparar uma solução extrativa EtOH : H₂O por ultrassom é a extração da maior quantidade dos princípios ativos de uma droga, bem como a separação destes em relação àqueles componentes inativos, e isto depende fundamentalmente da seletividade do solvente utilizado. O processo de escolha do solvente é um passo inicial para padronização do extrato garantindo a presença dos constituintes químicos de interesse.

Aumentando o teor alcoólico (80 e 96%) do solvente houve uma maior quantidade de resíduo seco formado para esse processo. Dados na literatura mostram que o resíduo seco originado do extrato hidroalcoólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi avaliado no teor de EtOH (50, 70 e 96 %) por três métodos de extração (percolação, maceração e turbólise) apresentaram variações quanto a formação do resíduo seco (VACCARI, 2012). Isso nos leva a ressaltar que o processo de extração por ultrassom juntamente com um maior teor do solvente favorece a obtenção de uma maior quantidade de resíduo seco.

Nesse caso selecionamos para o teor de 80% que obteve um resíduo seco de 1,2074 g para outras etapas da padronização do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Na literatura está descrita algumas atividades do extrato a 80%. Uma destas é que o extrato hidroalcoólico das folhas teve ação antibacteriana em diferentes concentrações frente às bactérias testadas, apresentando bons resultados para *S. aureus* ATCC, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *S. agalactiae* e *P. aeruginosa* ATCC, tendo melhor ação sobre *S. dysgalactiae*, com valor de CIM de 3,9% . Utilizando o método de difusão em Agar, GUERRA (2000) demonstrou ação do extrato fluido (etanol a 80%) das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Através da mesma técnica, SILVA et al., (2010) observaram ação do óleo essencial das folhas frente a 9 cepas de *Staphylococcus* spp..

A proporção da droga é um fator importante para conhecer e quantificar os constituintes químicos presentes. Utilizando a proporção da droga de 10, 20 e 30 % a maior concentração dos constituintes α -pineno e limoneno foi

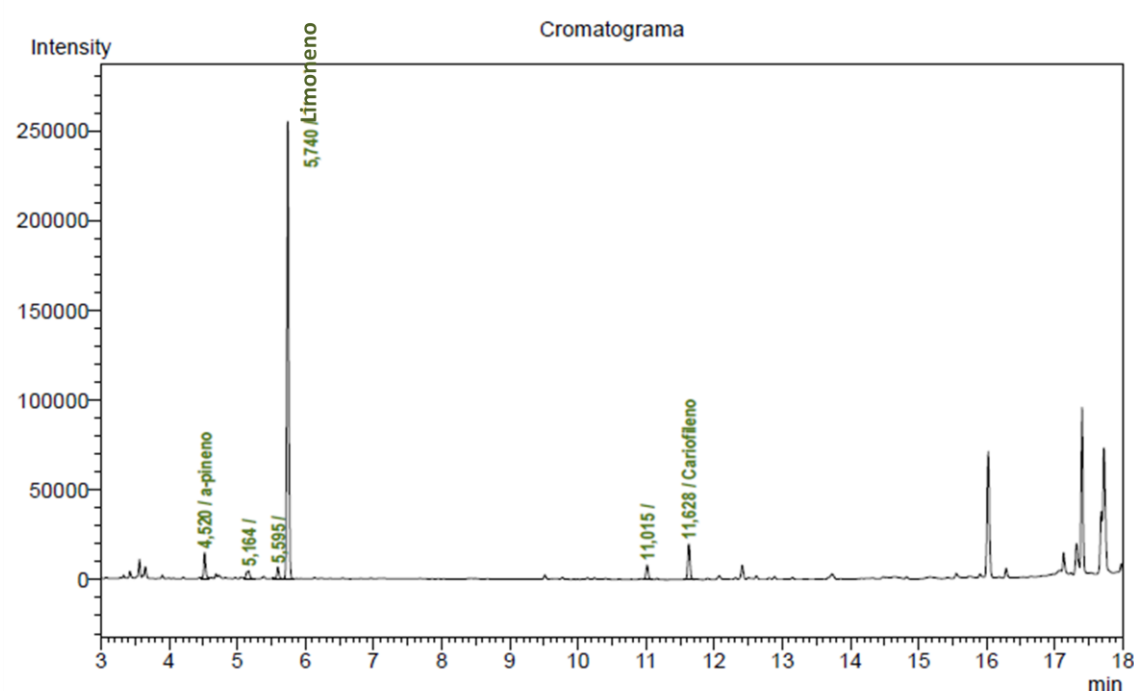
observada quanto maior a proporção da droga foi analisada, sendo 0,0042 $\mu\text{L/mL}$ e 0,0473 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente como pode ser visto na tabela 3 . O limoneno é o constituinte majoritário presente nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Proporção droga/solvente	α-pineno ($\mu\text{L/mL}$)	Limoneno ($\mu\text{L/mL}$)
10 %	0,003	0,0366
20 %	0,0036	0,0441
30 %	0,0042	0,0473

Tabela 3: Quantificação dos constituintes químicos por GC-FID de acordo com a proporção droga/solvente.

O cromatograma 3 é o registro original e mostra o tempo de retenção de cada constituinte até surgir os picos de α -pineno e limoneno contidos na droga vegetal a 30% de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Na literatura está descrito a atividade anti-inflamatória e cicatrizante, *in vivo*, de *Schinus terebinthifolius* Raddi 30% em Orabase (MARTORELLI, et al., 2011).



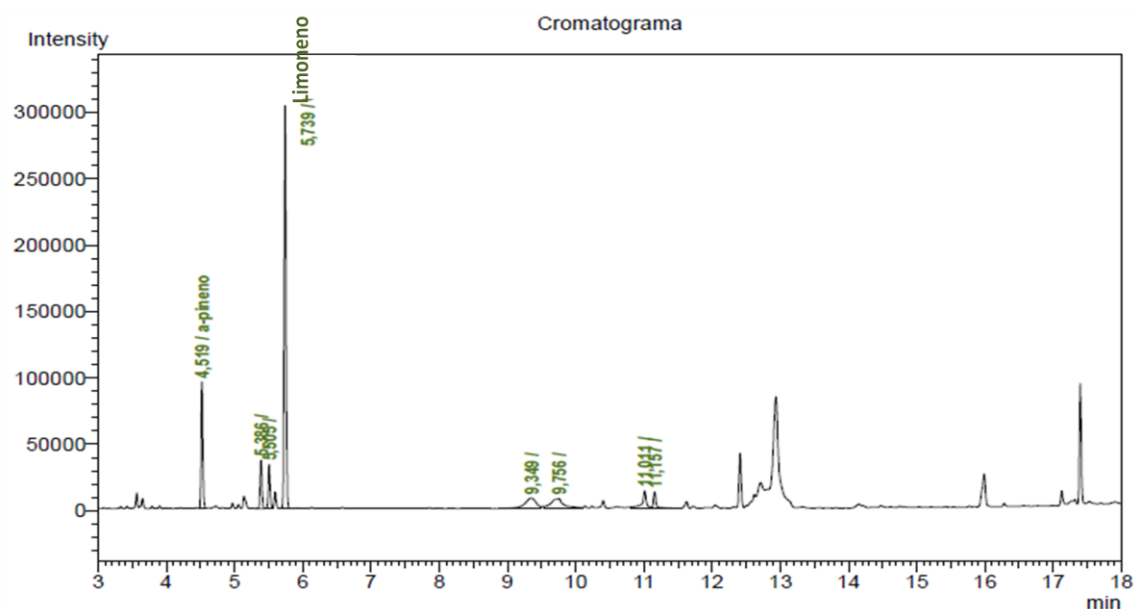
Cromatograma 3: Espectro do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi referente a 30 μ L por GC-FID, mostrando os picos dos constituintes químicos α -pineno e limoneno.

É importante considerar que a escolha do tempo de extração deve ser racional, pois quanto maior o tempo de exposição dos compostos ao ultra-som, maior a possibilidade de ocorrer degradação dos mesmos, além de ao final de longo período obter-se resultado semelhante em rendimento ao obtido em períodos mais curtos (LISTI; SCHIMIDT, 1989). Avaliamos a cinética de extração do α -pineno e limoneno por período de 5 a 60 minutos para escolher o melhor tempo de extração. No tempo de 10 minutos foram obtidos as maiores concentrações para o α -pineno (0,0202 μ L/mL) e o limoneno (0,15911 μ L/mL) mostrados na tabela 4. Isso garante a otimização do processo de extração, bem como reduz o tempo e os custos com a produção do extrato.

O cromatograma 4 mostra os picos referentes ao α -pineno e ao limoneno encontrados no extrato a 30% de droga e com teor hidroalcoólico de 80%.

Tempo (minutos)	α -pineno ($\mu\text{L/mL}$)	Limoneno ($\mu\text{L/mL}$)
5	0,00629	0,07297
10	0,02024	0,15911
20	0,0097	0,07344
30	0,01005	0,0745
40	0,01426	0,10404
50	0,01319	0,09855
60	0,01188	0,08485

Tabela 4: Cinética de extração dos constituintes químicos.



Cromatograma 4: Espectro do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi obtido por 10 minutos de extração por ultrassom.

6 Considerações finais

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível obter parâmetros de qualidade do derivado vegetal em estudo, levando em consideração o teor dos marcadores químicos, a proporção droga:solvente, o teor alcoólico e as condições físico-químicas, além de certificar a qualidade do mesmo. Essa avaliação proporcionou a otimização da obtenção do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi viabilizando o seu emprego em formulações

fitoterápicas de com eficiência, baixo custo operacional e fácil operação, como também foi possível através do processo de ultrassom minimizar o uso de solvente e não levar a perdas do mesmo por evaporação. Dessa forma, é possível garantir a população o acesso a produtos fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia.

7 Agradecimentos

Ao laboratório Rabelo por ceder o material vegetal e o espaço físico para a realização dos experimentos, bem como o acompanhamento no processo de obtenção e caracterização do extrato.

8 Referências

ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P. C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, p. 575-582, 2003.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras – conhecimentos populares e científicos**. Ed. Hemus, São Paulo, SP, 342 p, 1993.

AMORIM, R.; GALHARDO, A.; VALADÃO, C. A. A.; PECCININI, R. G. REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed. p. 43-74, 2003.

AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**. Rio de Janeiro, 25(2):95-102, 2003.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 678-689, 2006.

Aquino Neto, F. R.; Nunes, D. S. S.; **Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins**, Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2003.

BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **Trends Analytical Chemistry**, v. 21, n. p. 9-10, 2002.

BARBOZA, J.C.S; SERRA, A.A. Ultrassom (I): Influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 302-316, 1992.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, 2007. BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006.

BICCHI, C.; BRUNELLI, C.; CORDEIRO, C.; RUBIOLO, P.; GALLI, M.; SIRONI, A.; **Journal Chromatography**, v. 1024, p. 195, 2004.

CARLINE, E. A. Plants and the central nervous system. *Pharmacol Biochem Behav*, 75 501-512, 2003.

CARLINE, E. A.; RODRIGUES MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.16: p. 690-695, 2006.

CARLINI, E. A.. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruo nurundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARVALHO, M. C. et al. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**. New York, v. 42, n. 3, p. 185-191, 2003.

CHINCHOLE, R.; HATRE, P. M.; DESAI, U.; CHAVAN, R. Recent applications of hyphenated liquid chromatography techniques in forensic toxicology: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v. 14, n. 1, 2012.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a gás. São Paulo: Edgard Blucher, 1985.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas/SP: UNICAMP, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., Fundamentos de Cromatografia. Campinas: **Editora Unicamp**, 2006.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, 2006.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1287-1300, 2006.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. **Plantas Medicinais: do cultivo a terapêutica**. 7ª ed.. Petrópolis, RJ, Ed. Vozes, 248p, 2008.

DINIZ, M. F. F. M. Memento fitoterápico: As plantas como alternativa farmacêutica: aspectos populares e científicos. **EDUEPB**, João Pessoa, 205 p, 1997.

DI STASI, LC **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

DIXON, R. A.; Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843–847, 2001.

DUARTE, M. R., TOLEDO, M. G.; OLIVEIRA, R. B.. Diagnose morfoanatômica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão Acadêmica**, Paraná, v. 7, n. 2, p. 5-13, 2006.

ETTRE, L. S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 51, n. 1/2, 2000.

FABROWSKI, F. J. *Eucalyptus smithii* R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil, Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR. (Tese de doutorado), 1-2 p, 33-34 p, 2002.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, p. 165-166, 168-171, 175, 177, 2001.

GUERRA, M.J.M. et al., Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi, **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v. 5; p. 5-23, 2000.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCIA-REYES, J. F.; MOLINA-DIAZ, A. Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 780-786, 2012.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extration of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparation with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2007.

JIANYONG, W.; LIDONG, L.; FOO-TIM, C. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 347-352, 2001.

JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 632-637, out./dez. 2007.

JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Revista de Ciências Farmacêuticas** (São Paulo), v. 17, p. 139-45, 1996.

KORN, M.; PEREIRA, M.G.; BORGES, S.S. Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 96, p. 51-55, 2005.

LENZ, M. e ORTH, A. I., Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiacease), em restinga da ilha de Santa Catarina, Brasil. CCA/**Universidade Federal de Santa Catarina**, Curitiba – SC, p. 70-72, 2004 .

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. D. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAUN, N.; Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, p. 105 -137, 2006.

LIMA, E.O. et al. Propriedades Antibacterianas de Óleos essenciais de Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 3, p. 251-258, set./dez. 2003.

LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. Phytopharmaceutical technology. Boca Raton: **CRC Press**, 374p, 1989.

LLOYD, H.A. et al. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301-1302, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas Medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas. Nova Odessa - SP: **Instituto Plantarum**, 544p, 2002.

LUCENA, P.L.H. et al. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 46-51, 2006.

MACHADO, S. R., GUERREIRO, S. M. C.; Estrutura de desenvolvimento de canais secretores de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Acta Botânica**, p. 189-195, 2001.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. 2. Ed. Fortaleza: **UFCE**, 320p, 1994.

MARTÍNEZ, M. J.; ALONSO, G. N.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana Del *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.

MARTORELLI, S. B. F.; PINHEIRO, A. L. B.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; BRAVO, F. Efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus Terebinthifolius* Raddi (AROEIRA) a 30% em Orabase- estudo "in vivo". **International Journal of Dentistry**, Recife, p. 80-90, 2011.

MELECCHI, M.I.S.; PÉRES, V.F.; DARIVA, C.; ZINI, C.A.; ABAD, F.C.; MARTINEZ, M. M.; CARAMÃO, E. B. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 242-250, 2006.

MOURA, F. T.; VIEIRA, M. A. R.; FACANALI, R.; HABER, L. L.; OLIVEIRA, F.; MARQUES, M. O. M. Caracterização química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira vermelha). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 4., 2007, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza, 2007.

NAKASHIMA, K. High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples. **Journal of Health Science**, Tokio, v. 51, n. 3, p. 272-277, 2005.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2003.

NISBET, I. J.; MOORE, M. Will natural products remain na important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 8, p. 708-712, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 384p, 1995.

OLIVEIRA, S. T. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 7, n. 1, p. 61-5, 2000.

PAULO, P. T. C., Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n.1, p. 68-76, 2009.

PERES, T. B.; Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PIERIBATTESTI, J. C.; Annales dês Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique, v.74, p. 11-16, 1981.

PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 299-301, 2001.

QUEIRES, L. C.; CRÉPIN, M.; VACHEROT, F.; TAILLE, A.; RODRIGUES, L. E. Os efeitos *in vitro* de polifenóis extraído da planta Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre o crescimento de células de câncer de próstata **Brazilian Journal of Medicine and Human Health**, vol 1, 2013.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Presença S. A Colombia, 1997.

SANTOS, O. J. Evaluation of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extract on the healing process of gastroraphy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, Suppl2, p. 39-45, 2006.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, 2007.

SANTOS, O. J. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. ABCD, arq. bras. cir. dig. [online], vol.25, n.3, pp. 140-146, 2012.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; TURATTI, I. C. C.; ZUCCHI, O. L. A. D.; DIAS, D. A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 415-421, 2004.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S.. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, 563-568, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, p. 232 - 235, 263 - 288, 289 – 319, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., p. 467-495, 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., Princípios de Análise Instrumental. **Bookman**, 5ª Ed. São Paulo, 2002.

SOUZA, T.M.; RANGEL, V.L.B.I.; PIETRO, R.C.L. Rr. Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – SP. Rev. Bras. Pl. Méd., Botucatu, v. 8, p. 151-154, 2006.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & contexto-enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VACCARI, D. P.; JÚNIOR, A. S.; SACRAMENTO, L. V. S. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Otimização de procedimentos básicos para extração de princípios ativos. Araraquara, 2012.

VELÁZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 2, p. 91-97, 2003.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

XU, X. M.; YU, S.; LI, R.; FAN, J.; CHEN, S. H.; SHEN, H. T.; HAN, J. L.; HUANG, B. F.; REN, Y. P. Distribution and migration study of pesticides between peel and pulp in grape by online gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 161-169, 2012.